

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **60083583 A**(43) Date of publication of application: **11.05.85**

(51) Int. Cl.

C12N 15/00(21) Application number: **58191378**(22) Date of filing: **13.10.83**(71) Applicant: **RIKAGAKU KENKYUSHO**

(72) Inventor:
KASUYA KEIKO
TSUKAGOSHI MIKIRO
NOMIYA YOSHIO
IGAWA YOJI
KURATA SHUNICHI

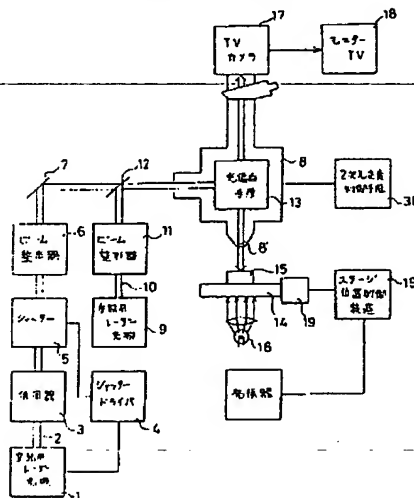
(54) PERFORATION APPARATUS OF LIVE CELL WITH LASER**(57) Abstract:**

PURPOSE: The titled perforation apparatus having an optical system for projecting laser beams emitted by a laser source to live cells and a monitor for monitoring the conditions of the live cells, and capable of carrying out the ingestion of a substance, e.g. DNA, into many cells under the same conditions in a very short time.

CONSTITUTION: Perforation laser beams 2 emitted by a perforation laser source 1 are converted into perforation laser beams within the ultraviolet light region in a frequency multiplier 3 and then passed through a shutter 5 and a beam shaper 6 to adjust the beam shape of the laser beams 2. The adjusted laser beams 2 are then directed to a condensing apparatus 8 by a reflecting mirror 7. On the other hand, reference laser beams 10 within the visible light wavelength region are emitted by a reference laser beam source 9 and adjusted to the beam shape of the laser beams 10 in a beam shaper 11, directed to the apparatus 8, superposed on the laser beams 2 and then introduced into the apparatus 8. The laser beams 2 and 10 introduced into the apparatus 8 are then condensed by a condensing lens 8' and projected onto live cells present with a solution containing a substance, e.g. DNA, in a sample holder 15 placed on a stage 14 to perforate the

cells. On the other hand, light obtained from the lighting of a lamp 16 from the rear of the sample holder 15 is passed through the condensing lens 8' in the opposite direction to grasp the conditions of the live cells with a TV camera 17 and a monitor TV 18 mounted on the upper part of the apparatus 8.

COPYRIGHT: (C)1985,JPO&Japio



⑫ 特 許 公 報 (B 2)

昭62-7837

⑬ Int. Cl.

識別記号

庁内整理番号

⑭公告 昭和62年(1987)2月19日

C 12 N 15/00
C 12 M 1/00
C 12 N 1/00
5/00
13/00

7115-4B
8114-4B
6712-4B
7115-4B
7823-4B

発明の数 3 (全11頁)

⑮発明の名称 生細胞レーザー穿孔装置

⑯特 願 昭58-191378

⑰公 開 昭60-83583

⑱出 願 昭58(1983)10月13日

⑲昭60(1985)5月11日

⑳発 明 者 粕 谷 敬 宏 和光市広沢2番1号 理化学研究所内
㉑発 明 者 塚 越 幹 郎 和光市広沢2番1号 理化学研究所内
㉒発 明 者 野 宮 芳 雄 和光市広沢2番1号 理化学研究所内
㉓発 明 者 井 川 洋 二 和光市広沢2番1号 理化学研究所内
㉔発 明 者 倉 田 俊 一 東京都府中市片町3-3-1
㉕出 願 人 理 化 学 研 究 所 和光市広沢2番1号
㉖出 願 人 科 学 技 術 庁 長 官
㉗代 理 人 弁 理 士 中 村 稔 外3名
審 査 官 広 田 雅 紀

1

2

⑳特許請求の範囲

1 レーザー光源、

このレーザー光源から発せられたレーザー光を生細胞へ投射する光学系、及び

前記の生細胞の状態を監視するモニターを備えることを特徴とする生細胞レーザー穿孔装置。

2 前記のモニターが、前記生細胞上に2次元的にレーザー光を走査する走査手段を含むことを特徴とする特許請求の範囲第1項記載の生細胞レーザー穿孔装置。

3 レーザー光源、

このレーザー光源から発せられたレーザー光を生細胞へ投射する光学系、

前記の生細胞の状態を監視するモニター、

このモニター上の生細胞の位置を決定する位置決定手段、

この位置決定手段からの始動信号にตอบสนองしてレーザー光源からのレーザー光の放出を制御するレーザー光制御手段、及び

前記の位置決定手段からの位置信号にตอบสนองしてレーザー光を指定位置に投射するよう前記のレーザー光の投射位置を制御する投射位置制御手段、を備えることを特徴とする生細胞レーザー穿孔

装置。

4 レーザー光源、

このレーザー光源から発せられたレーザー光を生細胞へ投射する光学系、

前記の生細胞の状態を監視するモニター、

このモニター上の生細胞の位置を決定する位置決定手段、

この位置決定手段からの位置信号にตอบสนองして指定位置を記憶する記憶装置、及びこの記憶装置からの位置情報を読み出してレーザー光を指定位置に投射するよう前記のレーザー光の投射位置を制御する投射位置制御手段、

を備えることを特徴とする生細胞レーザー穿孔装置。

発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は生細胞レーザー穿孔装置、更に詳細には動植物の生細胞にレーザー光を投射して、生細胞の細胞壁又は細胞膜に穿孔を開け、これを通してDNA等の物質を細胞又は細胞核に取り込ませる生細胞レーザー穿孔装置に関する。

(従来技術)

近年、動植物の生細胞に異種細胞の遺伝子移入

技術が確立しつつある。生物の形質を決定する多くの遺伝子がどのような遺伝情報を有しているかを解明するためには、この遺伝子移入技術を用いて、細胞に特定の遺伝子を移入し、この移入された細胞の形質の変化を観察するのが、最も効果的な方法である。例えば、癌化した細胞Aのどの遺伝子が発癌の遺伝情報を担っているかを知るためには、癌化した細胞AからDNAを抽出し、これを断片化した後正常細胞Bに移入し、その正常細胞Bが癌化すれば、移入した断片に発癌遺伝子が含まれていることが判る。即ち、遺伝子移入技術は癌の原因と考えられる発癌遺伝子を検索するうえでも、極めて重要な手段となつてゐる。

ところで、遺伝子移入を行なう具体的な方法としては、リン酸カルシウムでDNAを沈澱させ食作用を通じて細胞内へ移入する方法と、特開昭58-76091号に開示されるように光学顕微鏡下で細い針を使い、細胞に小さな穴をあけてDNAを注入する方法とが用いられている。しかしながら前者の方法を使用すると、高い濃度のリン酸カルシウムで細胞を処理するので正常細胞の損傷を伴うとともに、DNAを移入できる確率は高々一万分の一程度の低率であるという問題がある。また後者の方法では熟練と多大の労力を要し、やはり一定時間に多量の細胞にDNAを移入することには限度がある。多数の細胞にDNAを同一条件ですみやかに移入できることが望まれるが、発現効率の極めて小さな遺伝子も存在するので、短時間に多数の細胞を処理しうることが特に望まれる。

また、上記従来の遺伝子移入技術では、堅固な細胞壁を有する植物細胞には、遺伝子を移入することができなかつた。

(発明の目的)

従つて、本発明の目的はDNA等の物質を短時間に極めて多数の生細胞に同一条件ですみやかに移入することのできる装置を提供することにある。

また、本発明の別の目的は各種の動植物の生細胞に特殊な処理を加えることなく、穿孔を開けることのできる装置を提供することにある。

(発明の構成)

上記目的を達成するために本発明者が鋭意研究を行なつたところ、生細胞にレーザー光を投射すると、その投射された細胞の表面状態が改変して

DNA等の物質を取込める状態(以下、この状態を説明の便宜上仮に「穿孔」とし、かつこの状態を形成することを「穿孔を開ける」と言うことにする)になることを見出した。本発明はかかる知見に基づくものである。

即ち、本発明の第1のレーザー穿孔装置は、
レーザー光源、

このレーザー光源から発せられたレーザー光を生細胞へ投射する光学系、及び、

前記の生細胞の状態を監視するモニターを備えることを特徴とする。

また、本発明の第2のレーザー穿孔装置は、レーザー光源、

このレーザー光源から発せられたレーザー光を生細胞へ投射する光学系、

前記の生細胞の状態を監視するモニター、

このモニター上の生細胞の位置を決定する位置決定手段、

この位置決定手段からの始動信号にตอบสนองしてレーザー光源からのレーザー光の放出を制御するレーザー光制御手段、及び

前記の位置決定手段からの位置信号にตอบสนองしてレーザー光を指定位置に投射するよう前記のレーザー光の投射位置を制御する投射位置制御手段、を備えることを特徴とする。

更に、本発明の第3のレーザー穿孔装置は、レーザー光源、

このレーザー光源から発せられたレーザー光を生細胞へ投射する光学系、

前記の生細胞の状態を監視するモニター、

このモニター上の生細胞の位置を決定する位置決定手段、

この位置決定手段からの位置信号にตอบสนองして指定位置を記憶する記憶装置、及びこの記憶装置からの位置情報を読み出してレーザー光を指定位置に投射するよう前記のレーザー光の投射位置を制御する投射位置制御手段

を備えることを特徴とする。

即ち、本発明の本質的な特徴はレーザー光を生細胞に投射することにより、先に定義された意味での「穿孔」を開けるようにしたことにある。

なお、本発明において生細胞の状態を監視するモニターとは、TVカメラ等のように、生細胞の映像をとらえられるものの外に、分光手段等の、

生細胞の物性的な特性をとらえるものをも含むものとする。

(発明の効果)

本発明においては、本質的にレーザー光を用いたことにより得られる種々の効果を得ることができる。即ち、レーザー光は偏向手段等により安易にその投射位置を高速かつ精密に制御することができるとともに、瞬時にして穿孔を開けることができるので、一定時間内に極めて多数の生細胞に穿孔を開けることができる。さらに、レーザー光はいくつかの特異な性質を有しているので生細胞のオペレーションには極めて有利である。即ち、レーザー光は指向性が大変優れており、これを顕微鏡に導入すると、その限界分解能まで小さな焦点を結ばせることができるので、細胞の照射面積を広い範囲で調整することができる。こうして生細胞に修復可能で且つ物質の透過性の高い最適な大きさの「穿孔」を開けることができる。また、レーザー光の波長を細胞壁や生体膜の光学的特性(吸収率、吸収スペクトル特性)に最も適した波長に選ぶこともでき、一層効率よく「穿孔」を開けることが可能となる。さらに、レーザー光としてパルスレーザーを使用し、そのパルス幅を調整すれば体積の小さな細胞の温度を高めることなく、即ち細胞を生かしたままで「穿孔」を開けることが極めて容易である。また、レーザー光の使用は電気制御系又はTVモニターとの連携を容易にし、穿孔作業の迅速かつ精確な制御を可能とする。さらに、レーザー光はその強度を電氣的に広範囲に制御しうることや、細胞内への焦点の深さを自由に光学的に調整することもできる。

このように、本発明はレーザー光を用いたことにより、生細胞に修復可能な穿孔を極めて高い効率で開けることができる。

また、堅固な細胞壁を有する植物細胞に対しても細胞壁を取り除かなくても、遺伝子を移入することが本発明によると可能となる。

従つて、細胞内への遺伝子の移入に本発明を用いることにより、いろいろな有用物質の細胞内生産(例えばヒトの有用物質(インシュリン等)を生細胞内で合成)、家畜や農産物の品種改良のための遺伝子移入(交配しない異属間植物での遺伝子の置換;受精を経由しない増殖での優良遺伝子の導入)を実現することができる。

(実施例)

以下、本発明を添付図面を用いて説明する。

第1図は本発明のレーザー穿孔装置の一実施例を示す概略図である。

YAGレーザー等の穿孔用レーザー光源1から発せられた長波長1060nmの穿孔用レーザー光2はKDP等からなる倍周器3により紫外線領域の穿孔用レーザー光(波長335nmまたは265nm)に変換されたのち、シャッタードライバ4により制御されるシャッター5を通過して、ビーム整形器6によりレーザー光2のビームの形状が調整されたのち反射鏡7により顕微鏡をかねた集光装置8方向へ向けられる。他方、He-Neレーザー等の参照用レーザー光源9からは可視光波長領域の参照用レーザー光(例えば、波長633nm)10が発せられ、ビーム整形器11によりこの参照用レーザー光10のビームの形状が調整されたのち反射鏡12により集光装置8方向へ向けられ、穿孔用レーザー光2と重ね合わされて、集光装置8内へ導入される。集光装置8に導入された穿孔用レーザー光2および参照用レーザー光10は光偏向手段13を通過したのち集光レンズ8'により集光されステージ14上に載置された試料ホルダー15内にDNA等の物質を含有する溶液とともに存在する生細胞に投射される。生細胞に穿孔用レーザー光2が照射されると、この生細胞の穿孔用レーザー光2が投射された部分には周囲のDNA等の物質を内部に取り込める状態に改変する。即ち、本明細書でいう「穿孔」が開けられることになる。試料ホルダー15の背面からはランプ16により照明が得られ、試料ホルダー15を通過した光が集光レンズ8'を逆に通過して集光装置2の上部に取り付けられたTVカメラ17により試料ホルダー15内に投入された生細胞の位置分布のイメージがとられ、これがモニターTV18上に可視像として再現される。試料ホルダー15を載置するステージ14は2次元的に駆動できるいわゆるX-Yステージである、このステージ14はステージ位置制御装置19から発生されたパルス数に応じて所定の角度だけ回転するパルスモータ20により精密に駆動される。なおシャッター5はシャッタードライバ4によりその開閉が制御され、レーザー光2の通過を制御する。このように構成されたレーザー生細胞穿孔装置にお

いては、生細胞への穿孔は例えば次のようにして行なわれる。試料ホルダー 15 中の生細胞の分布状態を、ステージ 14 を移動しつつモニター TV 18 により観察し、生細胞の分布している領域を選択し、次にシャッター 5 を開放してレーザー光 2 を試料ホルダー 15 に連続的に投射するとともに、ステージ 14 を移動すると、試料ホルダー 15 中の生細胞に穿孔が開けられる。このように生細胞に穿孔が開けられると、周囲の溶液中に存在する DNA 等の物質が、この穿孔を通して生細胞 10 内に取り込まれる。この後穿孔は数秒以内に修復され、特定の遺伝子情報を有する生細胞が形成される。本実施例においては装置が極めて簡易であるにもかかわらず、試料ホルダー 15 中の細胞の分布密度が高く、一種類のみの細胞しか存在しない場合は、有効な手段である。なお、光偏向手段 13 はレーザー光 2 および 10 を 2 次元的に偏向するものであり、例えば第 2 図に示されるように、2 つのガルバノミラーメーター 13', 13'' の組み合わせからなるものが使用される。この光偏向手段 13 を 2 次元走査制御手段 38 によりレーザー光 10 を 2 次元的に走査し、その時得られる反射光、発光、散乱光を集光装置 8 を介して TV カメラ 17 あるいはスチルカメラによりとらえらると、細胞の細部にわたる映像をとらえることができることを本発明者は見出したが、このレーザー 10 を走査することによって得られた細胞（ヒトの赤血球）の顕微鏡写真を第 3 図に示す。第 3 図において、中央部の白線に囲まれた部分が可視光レーザー 10 を走査することにより得られたものであり、その他の部分、即ちランプ 16 により得られた通常の顕微鏡写真では得られない内部構造を観察することができる。このようにレーザー光を走査することにより得られる反射光、発光、散乱光をとらえらると試料のより詳細な 35 映像を観察できることの理由は必ずしも明らかではないが、レーザー光を使用したことにより、極めて小さな焦点が集光レンズにより形成され、ある特定の焦点面のみからの画像情報が得られたものであると考えることができる。上述のレーザー 40 光の走査による生細胞の状態の監視を本発明において併用すると生細胞に穿孔を開けた際の内部構造の変化等を観察することができるので極めて有効である。

第 4 図は本発明のレーザー穿孔装置の別の実施例を示す概略図である。

本実施例は細管 20 中を生細胞を通過させ、この際穿孔用レーザー光源 21 により生細胞に穿孔を開けるようにしたものである。即ち生細胞を含有した懸濁液 22 は、生理食塩水等の保護液 23 とともに細管 20 を透過するが、この際まずプローブ用レーザー光源 24 と検出器 25 によつて生細胞の通過が検出され、この検出の際に検出器 25 から発せられる検出信号が CPU（中央処理ユニット）26 に入力される。しかる後この CPU 26 により制御されることにより所定のタイミングで穿孔用レーザー光源 21 からレーザー光が発せられて、集光レンズ 31 等からなる光学系を通過したのち生細胞にレーザー光が投射されて生細胞に穿孔が開けられる。懸濁液 22 あるいは保護液 23 内に DNA 等の物質を含有せしめておけば、この物質が生細胞中に取り込まれるようになることは言うまでもない。本実施例によると毎秒 1000 個程度の生細胞に穿孔を開けることができるという極めて高速な処理が可能となる。なお、検出器 25 としてプローブ用レーザー光源 24 から、発せられたレーザー光を生細胞を投射した際に生じる散乱光の散乱角を検出するものによれば、生細胞の大きさを検出することができ、これによつて生細胞の種類を特定することができる。（生細胞の大きさと生細胞の種類とはほぼ一対一に対応することが知られている。）このようにすると、複数の種類の生細胞が懸濁液 22 中に含有されていても特定の生細胞のみに穿孔を開けることができる。また、穿孔用レーザー光源 21 からのレーザー光の放出の制御も、レーザー光源 21 自体を制御するのではなく、レーザー光源 21 と細管 20 との間にシャッターを設けこれを制御するようにしてもよいことは言うまでもない。

第 5 図は本発明のレーザー穿孔装置の更に別の実施例を示す概略図である。

本実施例は生細胞を液滴とともに落下させ、この落下の際に生細胞にレーザー光により穿孔を開けるようにしたものである。

生細胞を含有した懸濁液 22 及び生理食塩水等の保護液 23 はそれぞれ空気ポンプ 27, 27' により加圧されることにより、ノズル 28 へ移送される。ノズル 28 へ移送された懸濁液 22 と保

護液 2 3 からなる生細胞を含有した混合液は、圧電素子等からなる超音波ノズル振動子 2 9 により、下方へ液滴 3 0 となつて落下する。この際まずプローブ用レーザー光源 2 4 と検出器 2 5 によつて液滴 3 0 中の生細胞の通過が検出され、この検出の際に検出器 2 5 から発せられる検出信号が CPU 2 6 に入力され、しかる後にこの CPU 2 6 により制御されることにより所定のタイミングで穿孔用レーザー光源 2 1 からレーザー光が発せられて、集光レンズ 3 1 等からなる光学系を通過したのち、生細胞にレーザー光が投射され生細胞に穿孔が開けられる。

本実施例においては、生細胞が液滴となつて落下するので、液滴に予め電荷を与えておき、図示されるように、電極 3 2, 3 2' により液滴の落下通路に電界を形成し、この電界を制御するようにすれば、各液滴を分類して集めることができる。即ち、生細胞の種類あるいは穿孔が開けられたか開けられなかつたかによつて生細胞を液留 3 3, 3 3' 等に分類して集めることができる。なお、DNA 等の細胞に取り込まれる物質は懸濁液 2 2、保護液 2 3 あるいは液留 3 3, 3 3' 内に存在せしめておけば、穿孔が開けられた生細胞に取り込まれることになる。また、穿孔用レーザー光源 2 1 からのレーザー光の放出の制御も、レーザー光源 2 自体を制御するのではなく、レーザー光源 2 1 と液滴 3 0 との間にシャッターを設けこれを制御するようにしてもよいこと、およびレーザー光の放出を全く制御することなく連続的に放出するようにしてもよいことは上述と同様である。

第 6 図は本発明のレーザー穿孔装置の更に別の実施例を示す概略図である。

本実施例においては、モニター TV 1 8 上の生細胞の位置を指示することによりこの指示された生細胞の位置を決定するライトペン 3 4 と、ライトペン 3 4 がモニター TV 1 8 上を指示することによりライトペン 3 4 の指示位置に対応するレーザースポットの位置を決定するスポット位置算出手段 3 5 が備えられており、この位置決定手段により決定された指定位置にレーザー光を投射するように、集光装置 8 内の光偏向手段 1 3 を制御するスポット位置制御装置 3 6 が設けられている。このスポット位置制御装置 3 6 は、位置決定手段

により決定された座標位置を表わす位置信号が入力されると、レーザー光の投射が前記決定された位置で行なわれるように光偏向手段 1 3 を駆動する。このように構成された装置を使用して生細胞に DNA 等が取り込まれるように穿孔を開けるためには、試料ホルダー 1 5 内の生細胞の分布をモニター TV 1 8 でモニターし、モニター TV 1 8 上に映し出された所望の生細胞の特定の位置をライトペン 3 4 で指示する。このライトペン 3 4 の指示が行なわれると、指示した位置がスポット位置算出手段 3 5 により算出される。この算出された位置は位置信号となつてスポット位置算出手段 3 5 から出力され、スポット位置制御装置 3 6 に入力される。スポット位置制御装置 3 6 は入力された位置信号にตอบสนองしてレーザー光 2, 1 0 がライトペン 3 4 により指定された指定位置に投射するよう光偏光手段 1 3 を制御駆動する。また、ライトペンの指示が行なわれると、この指示の始動を示す始動信号が位置決定手段からほぼ同時に発せられ、シャッタードライバ 4 に入力し、所定の期間だけ、シャッター 5 が開放される。従つて所定のパルス数のレーザー光 2 がライトペン 3 4 より指示された位置へ投射される。穿孔が開けられた生細胞が周囲の DNA 等の物質を取り込んだ後、穿孔が修復して物質の移入が完了されるのは前述のとおりである。

本実施例においては、所望の生細胞の特定の位置に確実に穿孔を開けることができるという極めて優れた利点を得ることができる。

なお、本実施例においてはレーザー光の投射位置を制御するのに光偏向手段 1 3 をスポット位置制御装置 3 6 により制御駆動するようにしたが、ステージ 1 4 をステージ位置制御装置 1 9 により制御駆動するようにしてもよいことは言うまでもない。

第 7 図は本発明の穿孔装置の更に別の実施例を示す概略図である。

本実施例は、以下の様に装置が作動するように構成されている。即ち、ライトペン 3 4 により予めモニター TV 1 8 上に映し出された全てのあるいは複数の所望の生細胞の特定の位置を指示した後、これら指示したことによつてスポット位置算出手段 3 5 により算出された各位置は、デジタル化された位置信号とされ、CPU 40 を介してメ

モリ-41に記憶される。一旦メモリ-41に記憶された位置信号は、一つづつ読み出されてCPU 40等を介してスポット位置制御装置36に入力される。位置信号が入力されたスポット位置制御装置36は前記実施例と同様にして光偏向手段13を制御駆動する。また、これとほぼ同時にCPU 40からはシャッタードライバー4を駆動する駆動信号が発せられ、所定の期間だけシャッター5が開放され、レーザー光2の投射が行なわれる。従つて、予めライトペン34により指示された複数の指定位置にレーザー光2が順次投射される。このように構成されていると、モニター上の生細胞の位置を決定する作業を一括して行なうことができるので極めて効率よくかつ高速に多数の細胞に穿孔を開けることができる。なお、TVカメラ17から得られるビデオ信号の信号強度から生細胞が存在するか否かを判断することができるので、この機能をスポット位置検出器35に含ませれば穿孔作業を完全に自動化することができる。即ち、TVカメラ17からのビデオ信号をスポット位置検出器35により解析し、これによつて生細胞の位置を順次決定し、この決定された位置の情報をもつ位置信号をメモリ-41に流入し、これを指定位置として記憶させることも可能である。この場合生細胞を認識する手段としてパターン認識手段を使用することが可能である。

上記説明においてはモニターとしてTVカメラを使用した場合について説明したが、第7図に示されるように分光器42、光子計数器43、多チャンネル分析器44からなる分析手段をモニターとして使用することができる。即ち、試料の特定のポジションにおける分光特性を観察することにより、前記ポジションに生細胞が位置するか、あるいはさらに核が位置するかを判定することができる。このような分析手段をモニターとして使用する場合においても上述のように種々のレーザー穿孔装置を構成することが可能となる。

上述のある実施例においては、穿孔用レーザー光源と参照用レーザー光源の2つのレーザー光源が使用されたが、穿孔用レーザー光として可視光領域で連続発光のものが使用される場合は、レーザー光のスポット位置がTVモニターにより確認することができるので参照用レーザー光源は必ずしも必要でない。また、穿孔用レーザー光の放出

を制御するシャッターも機械的なものでなくてもよく、従来公知の光スイッチを使用することができる。さらに、本発明においては、パルスレーザーの代わりにCWレーザーを用いても、単位時間および単位面積当りの照射エネルギーを調整することにより同様の効果を上げることができる。

最後に、本発明を用いて実際に細胞内に物質が取り込まれたことを示す実験結果を記述する。

まず、オスボーンメンデルラットの腎臓の細胞由来の媒養細胞NRKを大腸菌由来の遺伝子(Xanthine - guanine phosphoribosyl - transferase)を取込まないと生存できない状態に処理し、このように処理したNRKを前記の遺伝子を含む媒質(DMEMに10%牛胎児血清を加えたもの)に加えた。このようにして作成された試料を第1図に示されるレーザー穿孔装置の試料ホルダーに装填した。試料ホルダーの器壁の一部は穿孔用レーザー光2に対して十分な透過性をもつ材質でつくられ、この部分に細胞を固着(懸垂)させた。次いで、穿孔用レーザー光源であるYAGレーザーから発射される波長1060nmのレーザー光を倍周器により波長335nmの紫外線領域のレーザー光に変換し、集光装置に導入し、パルス幅10ナノ秒のレーザーパルス毎秒10パルスの繰返し率で前記媒質中で器壁に懸垂している生細胞に照射した。その結果を第8図に示す。第8図の左半部はレーザー光が照射された部分であり、右半部はレーザー光が照射されなかつた部分である。

レーザー光を照射された生細胞は遺伝子を取込み生存しているのに対し、レーザー光を照射されなかつた生細胞はすべて死滅した。

生細胞は穿孔された直後に修復してしまう。このためTVモニターでは穿孔状態を確認できても写真撮影は困難であるので生細胞ではないがヒトの血球を染色し、これにレーザー光を照射して穿孔した状態第9図に示す。この図は生細胞に穿孔した直後の状態と同じ様相を示し、本発明の装置により細胞の特定個所を選択して穿孔することができることを示している。

40 図面の簡単な説明

第1図、第2図、第4図、第5図、第6図および第7図は本発明のレーザー穿孔装置の概略図、第3図は、細胞上をレーザー光により走査した際に得られる細胞の顕微鏡写真、第8図は本発明の

13

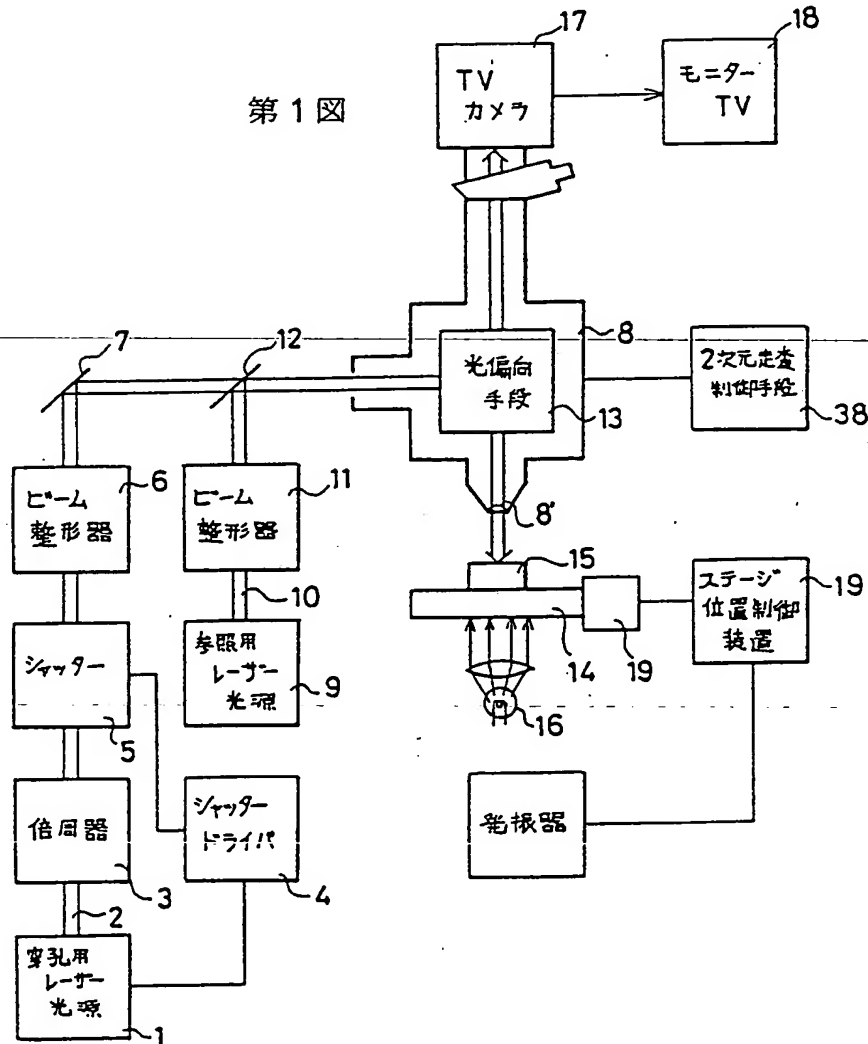
14

装置により遺伝子を移入した生細胞の形態を示す顕微鏡写真、第9図は穿孔を開けた細胞（ヒトの血球）を示す顕微鏡写真である。

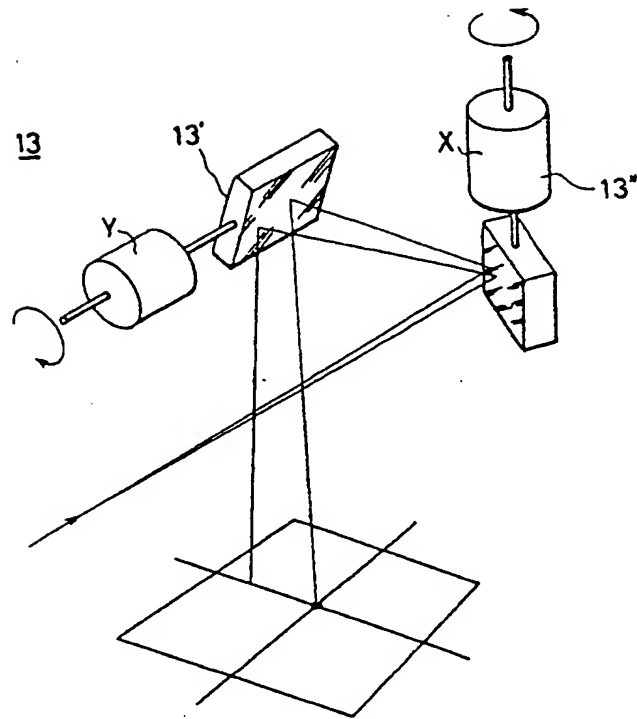
1, 21……穿孔用レーザー光源、2……穿孔用レーザー光、3……倍周器、4……シャッタードライバ、5……シャッター、6, 11……ビーム整形器、7, 12……反射鏡、8……集光装置、9……参照用レーザー光源、10……参照用レーザー光、13……光偏向手段、13', 13''……ガルバノメーターミラー、14……ステージ、15……試料ホルダー、16……ランプ、17……TVカメラ、18……モニターTV、19

……ステージ位置制御装置、20……細管、22……懸濁液、23……保護液、24……プローブ用レーザー光源、25……検出器、26……CPU、27, 27'……空気ポンプ、28……ノズル、29……超音波ノズル振動子、30……液滴、31……集光レンズ、32, 32'……電極、33, 33'……液留、34……ライトペン、35……スポット位置算出手段、36……スポット位置制御装置、40……CPU、41……メモリー、42……分光器、43……光子計数器、44……多チャンネル分析器。

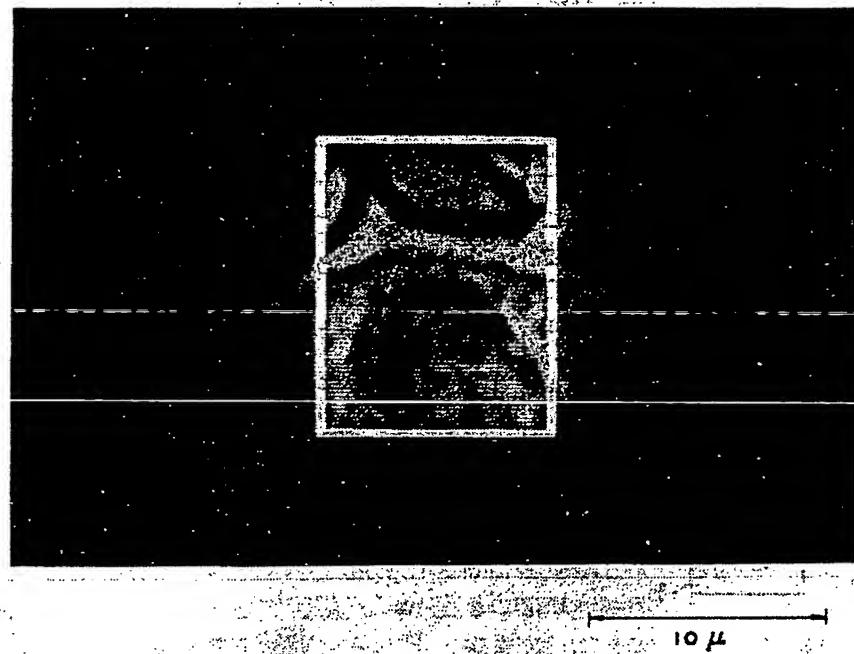
第1図



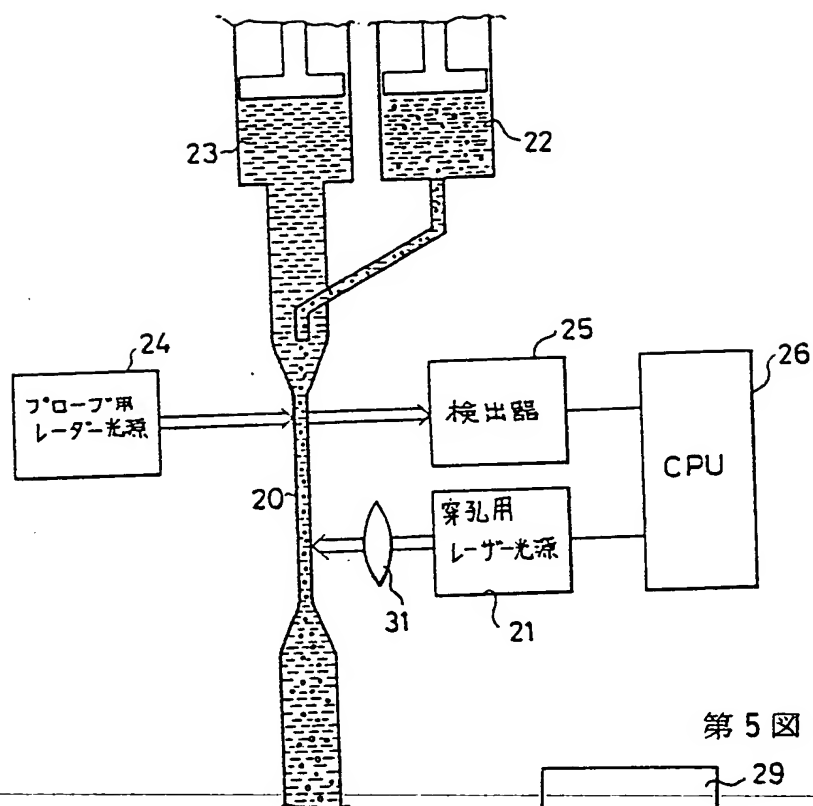
第 2 図



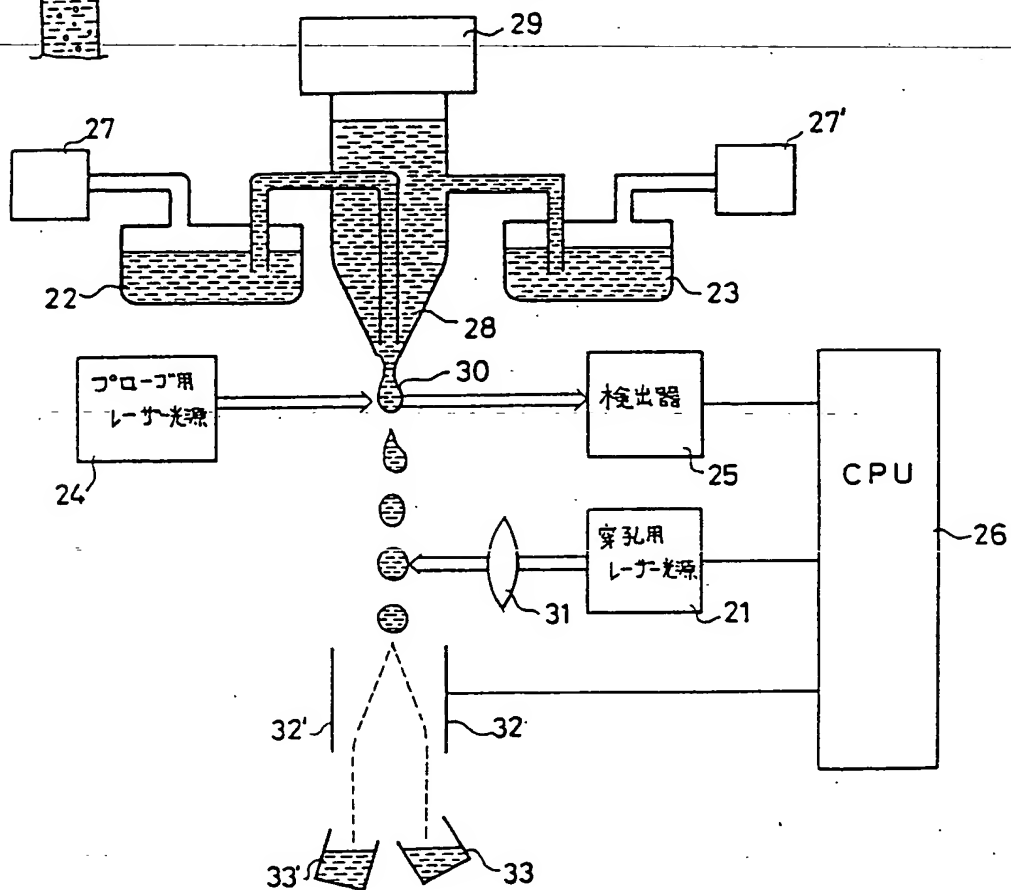
第 3 図



第 4 図

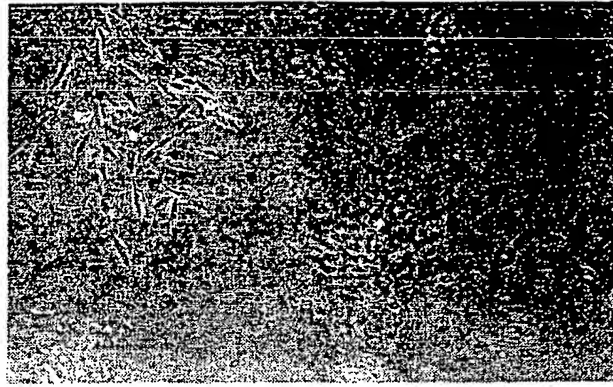


第 5 図



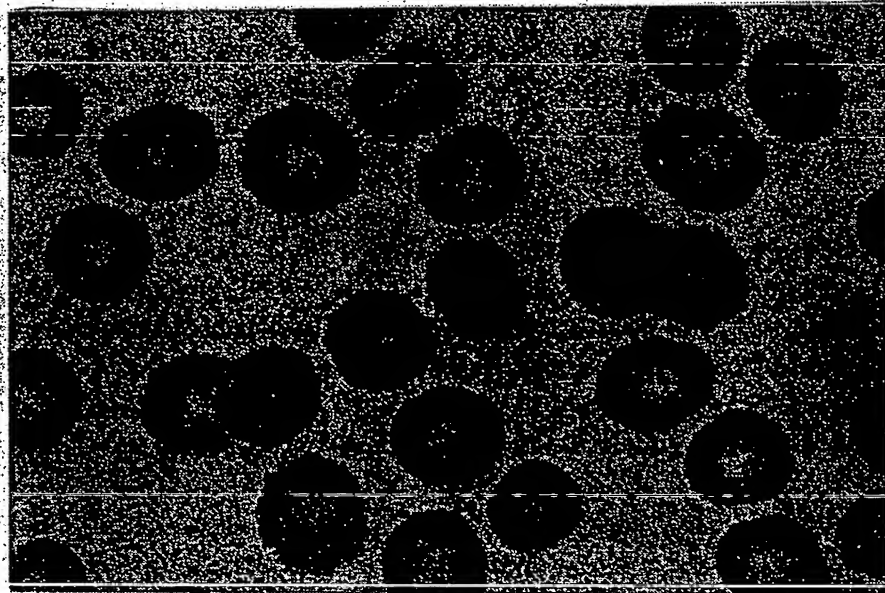
[illegible]

第 8 図



10 μ

第 9 図



10 μ